

## *Aureobasidium* spp. によるプルラン生産条件の検討

鈴木 千加・河東田 茂 義

山形大学農学部生物資源利用学講座

(平成9年9月1日受理)

### Relation between Pullulan Production and Growth Conditions in *Aureobasidium* spp.

Chika SUZUKI and Shigeyoshi KATOHD

Section of Bioresource Utilization, Faculty of Agriculture,  
Yamagata University, Tsuruoka 997, Japan

(Received September 1, 1997)

#### Summary

Production of pullulan by four strains of *Aureobasidium* spp. was compared in tomato-extract medium for the utilization of overripped tomato fruits. Furthermore, in order to clarify the relation between pullulan production and polysaccharide compositions of cell wall, cytoplasm, and cellular forms, we carried out studies under different culture conditions in synthetic media, varying carbon and nitrogen source, and adding ascorbic acid. After 4 days at 30°C in the synthetic media, it was found that the production of pullulan was maximal upon 5% sucrose and 0.1% ammonium sulphate as a carbon and nitrogen source, respectively, and 1.0% ascorbic acid. There appeared to be no causal relationship between the cell wall compositions and productions of pullulan. When the better conditions for the producing pullulan, significant amounts of swollen cells are always observed.

**Key words:** Pullulan, *Aureobasidium* spp., culture conditions, cell wall polysaccharides, cell forms

#### 緒 言

一般に黒酵母と呼ばれている *Aureobasidium* 属は、菌体外多糖を生産するという事で広く知られている<sup>1-8)</sup>。特に *A. pullulans* の生産するプルランは工業的に利用され<sup>2, 6, 7)</sup>、その収量を高めるための生産条件が検討され、栄養素では窒素源及び炭素源の影響<sup>8, 9)</sup>及び菌株や栄養条件以外の培養条件の影響<sup>3)</sup>が報告されている。一方、プルラン生産と細胞形態との関連性については様々な見解<sup>2, 8, 10-12)</sup>があり、さらに形態変化に伴う細胞壁多糖構造の変化も明確にされていない。

本研究では、本研究室で分離した *Aureobasidium* spp. 4菌株を使用し、はじめに、出荷できず廃棄されてしまうトマトの有効利用の目的で、トマト果実から調製したトマト抽出液培地を用いて菌体外多糖の生成過程

を検討した。次に、栄養源と生産される多糖の関連性の追求のために合成培地による培養を行い、プルラン生産の最適条件の確立を目的とした。最後に、細胞壁多糖と細胞質多糖の構造分析を行い、それによって菌体外多糖の生産過程と細胞壁あるいは細胞質との関連性を追求し、併せて細胞形態とプルラン生産の関連性を検討した。

#### 材料および方法

##### 1. 使用菌株と培養方法

本研究室で分離した *Aureobasidium* spp. A-1-2株, A-2-2株, A-3株及びB-3株の4菌株を使用した。トマト抽出液(完熟トマトを加熱抽出後、遠心分離(8000×g, 15分間)した上澄)に2%(w/v)の寒天を加えた斜面培地(pH5.5)から各々の菌株1白金耳をトマト抽出液培地(pH5.2)あるいは合成培地であるGL培地(グルコース5%(w/v), NaNO<sub>3</sub> 0.4%(w/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2%(w/v), MgCl<sub>2</sub> 0.01%(w/v), corn steep liquor 0.3%(w/v), pH 5.2) 10mlに植え、30°Cで60時間静置し

キーワード: プルラン, *Aureobasidium* spp., 培養条件, 細胞壁多糖, 細胞形態,

て前培養した。本培養培地は、トマト抽出液培地あるいはGL培地及び多糖生産における窒素源、炭素源及びアスコルビン酸添加の影響を検討するために、GL培地を以下のように改変した培地を使用した。窒素源の影響を調べるために硝酸ナトリウムの他に硫酸アンモニウムを用い、それらの濃度を0.05%から0.7% (w/v)まで変えた。炭素源はグルコースの代わりにスクロースあるいはキシロースを用い、その濃度を5% (w/v)とした。アスコルビン酸添加濃度の検討は0.1%から2.0% (w/v)まで変えて行った。さらに、多糖生産の最適条件の検討を行うために、GL培地の窒素源を硫酸アンモニウム0.1% (w/v)とし、炭素源をスクロース5% (w/v)にしたS培地、S培地にアスコルビン酸1.0% (w/v)添加したSA培地、SA培地の炭素源のみをグルコース5% (w/v)に変えたGA培地を使用した。これらの培地のpHを5.2に調整した後、500mlの三角フラスコに100mlずつ分注し、オートクレーブ後使用した。前培養培地から菌数が $10^6$  cells/mlになるように本培養培地(トマト抽出液培地あるいは各種の合成培地)へ接種し、30℃で4日間振盪培養した。

## 2. 生物量の測定方法と菌体外多糖、細胞壁及び細胞質の調製方法

生物量は、本培養後の培養液を冷却遠心(3000×g, 5 min)し、菌体を滅菌水で3回洗浄した後、凍結乾燥しその重量より求めた。菌体外多糖は、菌体を除去した上清を蒸留水で二晩透析後濃縮し、蒸留エタノールを等量加え、沈殿物を冷却遠心(3000×g, 5 min)によって取り出し、エタノール洗浄後、凍結乾燥して標品とした。細胞壁及び細胞質標品は既に報告した方法<sup>13)</sup>に従って調製した。なお、細胞の破碎にはブラウンホモジナイザーを用いた。

## 3. 構成成分の分析方法

構成糖の定量はガスクロマトグラフィー<sup>13)</sup>を用い、全糖量はDuboisらの方法<sup>14)</sup>、還元糖量はDNPA法<sup>15)</sup>、タンパク質量はLowryらの方法<sup>16)</sup>に従って測定した。

## 4. 酵素消化による多糖構造の分析

生産された菌体外多糖、細胞壁多糖及び細胞質に含まれる多糖の構造様式を調べるために、エンド- $\beta$ -1,3-グルカナーゼ(EC 3.2.1.39)として市販のZymolyase 20T(生化学工業株)、 $\alpha$ -デキストラン-エンド- $\alpha$ -1,6-グルコ

シダーゼ(EC 3.2.1.41)として市販のPullulanase(生化学工業株)、エキソ- $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.3)として市販のGlucoamylase(Sigma)の3種の酵素を使用して、菌体外多糖、細胞壁多糖及び細胞質多糖の酵素消化率を求めた。それぞれの酵素の指標基質として、Zymolyaseには直鎖の $\beta$ -1,3-グルカンであるカードラン(和光純薬工業株)、Pullulanase及びGlucoamylaseにはプルラン(東京化成工業株)を用いた。酵素分解はそれぞれの使用マニュアルに従った。各々の標品に含まれる $\beta$ -1,3-グルカン含量、プルラン含量及び $\alpha$ -グルカン含量は、指標基質として使用したカードランとプルランに対する各々の酵素消化率(グルコース量に換算した還元糖生成量/指標基質重量)を100%として、各標品の酵素消化率(グルコース量に換算した還元糖生成量/標品重量)から算出した。

ペーパークロマトグラフィーによる菌体外多糖のPullulanase分解生成物の確認は、東洋濾紙No50を用いて、n-ブタノール:ピリジン:水(6:4:3)による3回展開によって行った。

また、細胞壁に含まれる構成多糖の分析は次のように行った。既報<sup>17)</sup>に従い、Zymolyaseによる細胞壁の消化生成物をBio-Gel P4カラム(1.5×50cm)によるゲル濾過後、全糖量を測定して高分子画分、中間画分及びグルコースとオリゴ糖を含む低分子画分に分画した。低分子画分に含まれるグルコース総量から $\beta$ -1,3-グルカン含量、中間画分に含まれる $\alpha$ -グルカン含量はGlucoamylaseによる消化率により、高分子画分に含まれるガラクトースとマンノース量の総和をガラクトマンナン含量として算出した。

## 結 果

### 1. トマト抽出液培地及びGL培地による菌体外多糖の生産

A-1-2, A-2-2, A-3及びB-3の4菌株におけるトマト抽出液培地及びGL培地による本培養4日目に得られた菌体外多糖の収量、構成糖含量、タンパク質含量と、菌体外多糖のプルラン及び $\beta$ -1,3-グルカン含量の結果をTable 1に示した。

トマト抽出液培地における菌体外多糖は、A-2-2株とB-3株が5 g/lを超える高収量を示した。構成糖含量は、A-2-2株がグルコースを90%近く含み他の菌株よりも際立って高かった。またA-2-2株は、マンノース、ガラクトース含量が他の3菌株より低かった。このこと

Table 1. Influence of strain upon yield, composition, and level of extracellular polysaccharide by *Aureobasidium* spp. incubated on tomato-extract medium and GL-medium.

| Strain | Medium | Yield (g/l) | Composition (%) <sup>a)</sup> |      |      |         | Level (%) <sup>a)</sup> |                      |
|--------|--------|-------------|-------------------------------|------|------|---------|-------------------------|----------------------|
|        |        |             | Glc.                          | Man. | Gal. | Protein | Pullulan                | $\beta$ -1, 3-Glucan |
| A-1-2  | Tomato | 3.81        | 60.6                          | 8.8  | 7.4  | 7.5     | 35.3                    | 8.2                  |
| A-2-2  | Tomato | 5.73        | 88.5                          | 3.1  | 4.9  | 7.0     | 39.8                    | 6.6                  |
| A-3    | Tomato | 3.25        | 57.3                          | 8.7  | 12.5 | 6.9     | 42.4                    | 12.5                 |
| B-3    | Tomato | 5.41        | 59.6                          | 6.1  | 9.0  | 6.0     | 44.2                    | 7.3                  |
| A-1-2  | GL     | 1.06        | 21.8                          | 7.4  | 5.5  | 11.4    | 3.0                     | 6.5                  |
| A-2-2  | GL     | 0.68        | 48.5                          | 5.8  | 4.1  | 3.2     | 32.3                    | 5.7                  |
| A-3    | GL     | 1.28        | 24.6                          | 10.8 | 7.4  | 9.9     | 2.4                     | 7.0                  |
| B-3    | GL     | 2.31        | 34.3                          | 9.1  | 9.6  | 6.6     | 3.8                     | 4.7                  |

GL-medium contained 5% glucose, 0.4% NaNO<sub>3</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgCl<sub>2</sub>, and 0.3% corn steep liquor (pH 5.2). All cultures were incubated at 30°C for 4 days.

<sup>a)</sup> values are expressed as % dry weight of polysaccharide.

よりトマト抽出液培地ではA-2-2株が、ヘテロ多糖含量が低くグルカン含量が高い多糖を多量に生産していることが示唆された。またタンパク質含量はいずれの菌株の多糖も6%前後であり違いはみられなかった。4菌株は菌体外多糖として、いずれもプルラン様多糖を比較的多く生産し、 $\beta$ -1,3-グルカンの生産は低いことが示唆された(例えば、指標基質として使用したプルランのPullulanase消化率は86.2%, カードランのZymolyase消化率は67.5%, A-2-2株のトマト抽出液培地を用いて得られた菌体外多糖のPullulanase消化率は34.3%, Zymolyase消化率は4.5%で、これらの消化率からそれぞれの含量を求めた)。細胞の形態は、菌糸体と分芽胞子がほとんどでほぼ1:1の割合であり、膨張細胞はわずかに認められたが、厚膜胞子は認められなかった。

一方、GL培地においては、4菌株とも菌体外多糖の収量はトマト抽出液培地と比較すると全体的に低下した。しかしB-3株が、比較的高い収量(2.31 g/l)であったが、プルラン及び $\beta$ -1,3-グルカン含量は著しく低く、他の多糖を生産していると思われ、B-3株は栄養源の変化により生産する多糖が変化することが示唆された。結果には示していないが、同時に培地のグルコース濃度を10%にした培養を行ったところ、収量は5%グルコース添加培地よりも約10%低くなり、マンノース、ガラクトース含量がいずれの菌株においても増加する傾向が見られた。このことよりこれ以降の培養において炭素源濃度は5%で行うことにした。細胞形態は、いずれの菌株においてもほとんどが分芽胞子であったが、A-2-2株にお

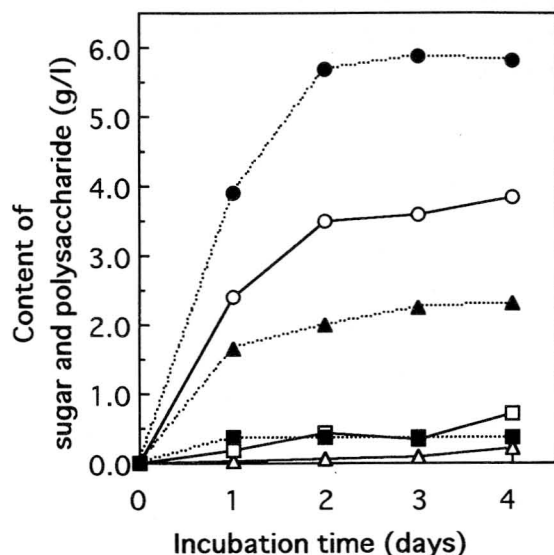


Figure. Time course of yield of polysaccharides and carbohydrate content of extracellular polysaccharides produced by *Aureobasidium* sp. A-2-2 on tomato-extract medium.

● : Yield of polysaccharide, ▲ : Yield of pullulan, ■ : Yield of  $\beta$ -1,3-glucan, ○ : Glucose, △ : Mannose, □ : Galactose.

いてのみ膨張細胞が約10%まで増加しており、厚膜胞子は数%であった。

以上の結果から、トマト抽出液培地においては、A-2-2株はB-3株よりプルラン収量は若干劣るが、4菌株中最も多量のグルカンを生産しており、かつヘテロ多糖含量が最も低いことより、この菌株を選択し、多糖収量と

構成糖の経時的変化をトマト抽出液培地を用いて検討した (Figure). 菌体外多糖の収量は培養2日目に5 g/lを超え、その後はほぼ安定した。またマンノース及びガラクトース含量はほとんど変化しないが、グルコース含量及びプルラン含量は培養2日目までに増加し、その後もグルコース含量は徐々に増加し4日目ではほぼ安定した。このことから以降の培養日数を4日間とした。

## 2. 炭素源、窒素源及びアスコルビン酸の菌体外多糖に及ぼす影響

B-3株は菌体外多糖の生産に最も培地組成の影響を受けやすいと思われた (Table 1) ため、この菌株を用いて炭素源 (スクロース、キシロース) 及び窒素源 (硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウム) による菌体外多糖の収量、構成成分、菌体量及びプルランと $\beta$ -1,3-グルカン含量への影響を調べた (Table 2)。炭素源については、プルランの生産を促進する炭素源として知られているスクロース<sup>a)</sup>と、 $\beta$ -グルカンを生産する炭素源として報

告されているキシロース<sup>b)</sup>を用いた。菌体外多糖の収量はスクロース添加培地で最も高い結果となり、グルコース添加培地の約1.6倍であり、多糖中のマンノース、ガラクトース含量は、スクロース添加培地で最も低く、ヘテロ多糖含量が低いと思われた。しかし、プルランと $\beta$ -1,3-グルカン含量とも10%前後と低く、他の多糖の生産も示唆された。キシロースは多糖生産を賦活化することはできなかった。この培養条件において多糖生産に最も適している炭素源はスクロースであることが示された。細胞形態は、グルコース、キシロース添加では分芽胞子が主な形態であったが、スクロース添加では、膨張細胞と分芽胞子の比率がほぼ同じで、他に伸長中の菌糸状形態が約3%観察された。

窒素源については、硝酸ナトリウムと硫酸アンモニウムのどちらとも、0.1%添加で最も高い菌体外多糖収量を得ることができ、それ以上の濃度では抑制された。しかし菌体量は、硝酸ナトリウム添加培地では多糖収量と同じ傾向を示し0.1%以上の濃度で減少していたが、硫

Table 2. Effect of sucrose or xylose and concentration of sodium nitrate and ammonium sulphate upon yield, biomass, composition, and level of extracellular polysaccharide by *Aureobasidium* sp. B-3.

| Carbon or nitrogen source | Concn. (%)        | Yield (g/l) | Biomass (g/l) | Composition (%) <sup>a)</sup> |                    |                    |         | Level (%) <sup>a)</sup> |                      |
|---------------------------|-------------------|-------------|---------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|---------|-------------------------|----------------------|
|                           |                   |             |               | Glc.                          | Man.               | Gal.               | Protein | Pullulan                | $\beta$ -1, 3-Glucan |
| Sucrose                   | 5.0               | 3.73        | 11.4          | 40.0                          | 6.2                | 6.5                | 7.2     | 9.8                     | 9.3                  |
| Xylose                    | 5.0               | 1.88        | 8.2           | 12.4                          | 10.7               | 10.5               | 11.3    | 3.3                     | 3.2                  |
| Sodium nitrate            | 0.05              | 1.37        | 11.8          | 48.6                          | 4.2                | 4.4                | 20.3    | 17.3                    | 6.0                  |
|                           | 0.1               | 4.57        | 14.0          | 64.5                          | 2.0                | 1.6                | 7.4     | 35.6                    | 6.3                  |
|                           | 0.2               | 2.36        | 12.7          | 48.7                          | 5.6                | 6.5                | 3.8     | 9.6                     | 8.8                  |
|                           | 0.3               | 2.83        | 11.8          | 41.6                          | 5.6                | 6.5                | 4.6     | 9.3                     | 7.7                  |
|                           | 0.4 <sup>b)</sup> | 2.31        | 9.7           | 34.3                          | 9.1                | 9.6                | 6.6     | 3.8                     | 4.7                  |
|                           | 0.5               | 1.68        | 11.3          | 35.5                          | 7.4                | 8.6                | 4.8     | 9.4                     | 7.9                  |
|                           | 0.7               | 1.33        | 10.8          | 34.1                          | 8.8                | 10.5               | 6.0     | 7.5                     | 9.8                  |
| Ammonium sulphate         | 0.05              | 1.81        | 12.3          | 66.2                          | 2.2                | 1.6                | 11.9    | 55.6                    | 6.6                  |
|                           | 0.1               | 4.86        | 14.9          | 76.8                          | N.D. <sup>c)</sup> | N.D. <sup>c)</sup> | 10.2    | 73.6                    | 3.1                  |
|                           | 0.2               | 1.02        | 20.1          | 44.7                          | 5.0                | 2.1                | 4.4     | 38.2                    | 6.3                  |
|                           | 0.3               | 0.92        | 20.5          | 56.9                          | 13.1               | 8.5                | 9.2     | 41.6                    | 4.7                  |
|                           | 0.5               | 1.42        | 21.2          | 45.9                          | 12.5               | 5.7                | 10.1    | 35.4                    | 10.1                 |
|                           | 0.7               | 1.28        | 21.1          | 48.1                          | 10.5               | 4.9                | 9.9     | 38.8                    | 8.7                  |

Sucrose or xylose was presented at a concentration of 5% instead of glucose as the carbon source in the culture medium. Each nitrogen source was present at the indicated concentrations instead of 0.4% NaNO<sub>3</sub>. The other culture conditions were same as shown in Table 1.

<sup>a)</sup> values are expressed as % dry weight of polysaccharide.

<sup>b)</sup> GL-medium (shown in Table 1.) <sup>c)</sup> not detected.

酸アンモニウム添加培地では濃度が増すに従って増加し、菌体量と菌体外多糖収量との関連性は認められなかった。多糖に含まれる構成糖は、どちらの窒素源においても0.1%添加においてグルコース含量が最も高く、特に硫酸アンモニウム添加培地では76.8%にも達し、それ以上の濃度では減少する傾向を示した。また マンノース、ガラクトース含量はどちらの窒素源においても0.1%添加で最も低く、硫酸アンモニウム0.1%添加では検出されなかった。硫酸アンモニウムを添加した場合、硝酸ナトリウム添加よりもプルラン含量が高く、0.1%添加において多糖の73.6%を占め、 $\beta$ -1,3-グルカンの生産も最も抑制されており、硫酸アンモニウム0.1%添加がプルラン生産に適していると思われた。これらの窒素源は細胞形態に影響を及ぼし、硝酸ナトリウム添加では殆ど分芽胞子で濃度が増すごとに厚膜胞子の割合が増加し、0.7%添加では約8%であった。一方、硫酸アンモニウム添加では膨張細胞が大部分を占め、濃度が薄いほど厚膜胞子が観察され、0.1%添加では約10%であった。菌糸体は、硝酸ナトリウム0.5%と0.7%添加培地で伸長途中の形態が約3%観察された以外は存在しなかった。

さらに、菌体外多糖の収量増加をもたらすことが知られているアスコルビン酸<sup>1, 19, 20)</sup>の影響を検討した。GL培地にアスコルビン酸を0.1から2.0%の5段階の濃度で添加した培地を用いて、B-3株により生産された菌体外多糖の収量、構成成分含量、菌体量及びプルランと $\beta$ -1,3-グルカン含量の結果をTable 3に示した。菌体外多糖はアスコルビン酸0.1%添加培地において、無添加培地よりも2倍近い収量を得ることができ、0.1%以上の添

加濃度では徐々に減少した。同様の傾向は菌体量にも見られた。一方、グルコース含量はアスコルビン酸の添加濃度が増すに従って増加し、1.0%添加で最も高く、マンノース、ガラクトース含量はアスコルビン酸添加の方が無添加よりも減少した。プルラン含量はアスコルビン酸の添加濃度の増加に従って高くなったが、 $\beta$ -1,3-グルカン含量はアスコルビン酸の添加濃度との関連性は認められなかった。プルランの収量及びグルコース含量と後述する多糖の色から、アスコルビン酸の添加濃度は1.0%が最適と判断した。細胞形態は、アスコルビン酸添加濃度が高まるに従い、膨張細胞の占める割合が高くなり、菌糸体が増加した。添加濃度が低いほど菌糸体は不完全で伸長中の形態が見られた。

これまで示したように、プルラン生産に及ぼす窒素源、炭素源及びアスコルビン酸の検討結果から、窒素源は0.1%硫酸アンモニウム、炭素源はスクロース、アスコルビン酸は1.0%添加がプルラン生産の増加に最も影響があると判断した。そのため、GL培地の窒素源を0.1%硫酸アンモニウムにし、炭素源をグルコースからスクロースとしたS培地、S培地にアスコルビン酸を添加したSA培地、SA培地の炭素源をグルコースに変えたGA培地において多糖生産の検討を行った。またB-3株の他に、GL培地において唯一プルラン様の菌体外多糖を生産したA-2-2株(Table 2)も培養し、2菌株により生産された菌体外多糖の収量、構成成分含量、菌体量及びプルランと $\beta$ -1,3-グルカン含量の結果をTable 4に示した。SA培地において、2菌株とも菌体外多糖の収量が最高値を示した。特にA-2-2株は13 g/lと非常に多量の菌

Table 3. Effect of concentration of ascorbic acid upon yield, composition, and level of extracellular polysaccharide by *Aureobasidium* sp. B-3.

| Concn.<br>(%)     | Yield<br>(g/l) | Composition (%) <sup>a)</sup> |      |      |         | Level (%) <sup>a)</sup> |                      |
|-------------------|----------------|-------------------------------|------|------|---------|-------------------------|----------------------|
|                   |                | Glc.                          | Man. | Gal. | Protein | Pullulan                | $\beta$ -1, 3-Glucan |
| 0.0 <sup>b)</sup> | 2.31           | 34.3                          | 9.1  | 9.6  | 6.6     | 3.8                     | 4.7                  |
| 0.1               | 4.47           | 37.2                          | 3.5  | 3.5  | 5.2     | 8.8                     | 7.8                  |
| 0.3               | 3.67           | 41.1                          | 4.1  | 4.5  | 5.9     | 12.5                    | 4.5                  |
| 0.6               | 3.52           | 40.4                          | 4.9  | 5.8  | 7.2     | 15.6                    | 5.8                  |
| 1.0               | 3.48           | 49.8                          | 5.4  | 5.5  | 6.9     | 18.3                    | 5.6                  |
| 2.0               | 3.06           | 44.7                          | 5.4  | 6.3  | 6.1     | 18.9                    | 4.5                  |

Ascorbic acid was added to GL-medium shown in Table 1 at the indicated concentrations. The other culture conditions were same as shown in Table 1.

<sup>a)</sup> values are expressed as % dry weight of polysaccharide.

<sup>b)</sup> GL-medium (shown in Table 1.)

Table 4. Influence of strain and culture medium upon yield, biomass, composition, and level of extracellular polysaccharide.

| Strain | Medium | Yield (g/l) | Biomass (g/l) | Composition (%) <sup>a)</sup> |                    |       |         | Level (%) <sup>a)</sup> |                      |
|--------|--------|-------------|---------------|-------------------------------|--------------------|-------|---------|-------------------------|----------------------|
|        |        |             |               | Glc.                          | Man.               | Gal.  | Protein | Pullulan                | $\beta$ -1, 3-Glucan |
| A-2-2  | SA     | 13.06       | 12.6          | 89.6                          | N.D. <sup>b)</sup> | N.D.  | 4.3     | 86.2                    | 3.0                  |
|        | S      | 12.03       | 11.7          | 90.3                          | N.D.               | N.D.  | 4.1     | 86.4                    | 3.8                  |
|        | GA     | 8.65        | 13.4          | 69.9                          | trace              | N.D.  | 6.3     | 66.3                    | 3.4                  |
| B-3    | SA     | 9.98        | 11.1          | 78.9                          | trace              | N.D.  | 5.4     | 74.7                    | 4.1                  |
|        | S      | 8.98        | 12.9          | 76.1                          | trace              | N.D.  | 7.2     | 70.7                    | 5.3                  |
|        | GA     | 7.82        | 12.0          | 67.0                          | 0.8                | trace | 6.2     | 64.3                    | 3.3                  |

All the media contained 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgCl<sub>2</sub>, and 0.3% corn steep liquor. SA-medium had 5.0% sucrose and 1.0% ascorbic acid. S-medium had 5% sucrose. GA-medium had 5% glucose and 1.0% ascorbic acid. The other culture conditions were same as shown in Table 1.

<sup>a)</sup> values are expressed as % dry weight of polysaccharide.

<sup>b)</sup> N. D., not detected.

体外多糖を生産した。A-2-2株とB-3株とを比較すると、どの培地においてもA-2-2株の方が収量は上回った。菌体量と菌体外多糖の収量の関連性はここでも認められなかった。また2菌株とも、いずれの培地でも、マンノース、ガラクトースはほとんど含まれず、グルカンのみを生産していることが示された。グルコース含量はSA培地とS培地において多く、特にA-2-2株では約90%を占めた。プルラン含量はA-2-2株のSA培地とS培地で80%以上であり、 $\beta$ -1,3-グルカンの生産は抑制されていた。細胞形態は、SA培地とS培地では分芽胞子と膨張細胞の比率がほぼ3:1であったのに対して、GA培地では分芽胞子の方が圧倒的に多かった。また厚膜胞子はS培地のみで約10%観察され、そのため多糖の色は厚膜胞子由来と思われるメラニン色素によってやや黒色化していた。SA培地、S培地、GA培地においてA-2-2株とB-3株により生産された多糖のPullulanaseによる消化生成物をペーパークロマトグラフィーによって同定した(結果は示さない)。どの多糖の消化生成物も、指標として用いた市販のプルランの酵素消化生成物と同様にマルトトリオースのみであり、真正のプルランを生産していることが確認された。

### 3. プルラン生産と細胞壁構成多糖の関連性の検討

プルラン生産と細胞壁組成の関連性を検討するために、プルラン生産を促進しなかったGL培地と最もプルラン生産を促進したSA培地を用い、A-2-2株とB-3株の培養2日目と4日目の細胞から細胞壁を調製して収量、組

成及びプルラン含量を調べた。その結果をTable 5に示した。細胞壁の収量を比較すると、培地及び菌株に関係なく、培養2日目より4日目の方が増加していたが、GL培地よりSA培地の方が2倍近くも増加していた。構成糖はどの細胞壁もグルコース含量が50%前後、マンノースは7%前後、ガラクトース含量は8%前後で、タンパク質含量は3.5%から10.0%といずれも培地と菌株との関連性は認められなかった。細胞壁に含まれるプルラン含量を直接Pullulanaseで消化して調べたところ、いずれの細胞壁においてもプルランをほとんど認めることができなかった。さらに、A-2-2株とB-3株の細胞壁の構成多糖の存在形態を調べるために、培養4日目の細胞壁をZymolyaseで消化し、材料および方法に示したように分画し、各画分から $\beta$ -1,3-グルカン、 $\alpha$ -グルカン及びガラクトマンナン含量を求め、その結果をTable 6に示した。培地と菌株にかかわらず主要な細胞壁構成多糖は $\beta$ -1,3-グルカンとガラクトマンナンであった。 $\beta$ -1,3-グルカン含量は、GL培地とSA培地を比較すると、2菌株ともGL培地の方が高く、特に、プルラン収量が高かったSA培地におけるA-2-2株の細胞壁の $\beta$ -1,3-グルカン含量が最も低かった。ガラクトマンナンと $\alpha$ -グルカン含量は、2菌株の細胞壁と2つの培地においても大差は認められなかった。以上の結果から、細胞壁中にはプルランやそれ以外の $\alpha$ -グルカンは極わずかししか検出されず、細胞壁からプルランが遊離してくるのではないことが示唆された。



Table 5. Influence of strain and culture medium upon yield and composition of cell wall.

| Strain | Medium | Incubation time (days) | Yield (g/l) | Composition (%) <sup>a)</sup> |      |      |         | Level of pullulan (%) <sup>a)</sup> |
|--------|--------|------------------------|-------------|-------------------------------|------|------|---------|-------------------------------------|
|        |        |                        |             | Glc.                          | Man. | Gal. | Protein |                                     |
| A-2-2  | SA     | 2                      | 2.1         | 46.6                          | 9.6  | 9.8  | 8.2     | 0.2                                 |
|        | SA     | 4                      | 4.7         | 49.6                          | 7.9  | 11.2 | 9.0     | 2.9                                 |
|        | GL     | 2                      | 2.1         | 45.7                          | 5.7  | 6.1  | 3.9     | 0.1                                 |
|        | GL     | 4                      | 2.3         | 50.8                          | 8.3  | 8.9  | 3.6     | 3.5                                 |
| B-3    | SA     | 2                      | 1.5         | 51.0                          | 8.8  | 8.3  | 4.0     | 3.2                                 |
|        | SA     | 4                      | 5.0         | 40.9                          | 7.2  | 8.8  | 3.5     | 2.1                                 |
|        | GL     | 2                      | 2.2         | 42.6                          | 5.3  | 6.0  | 10.0    | 4.9                                 |
|        | GL     | 4                      | 2.5         | 54.6                          | 8.1  | 10.9 | 8.9     | 3.2                                 |

The medium was same as shown in Table 4. The preparations of cell wall used were prepared after cultivation for 2 or 4 days.

<sup>a)</sup> values are expressed as % dry weight of cell wall.

Table 6. Influence of strain and culture medium upon yield of polysaccharide of cell wall.

| Strain | Medium | Level (%) <sup>a)</sup> |                  |               |
|--------|--------|-------------------------|------------------|---------------|
|        |        | $\beta$ -1, 3-Glucan    | $\alpha$ -Glucan | Galactomannan |
| A-2-2  | SA     | 22.2                    | 4.9              | 15.2          |
|        | GL     | 33.6                    | 3.3              | 14.0          |
| B-3    | SA     | 25.9                    | 3.8              | 15.0          |
|        | GL     | 30.0                    | 7.1              | 17.7          |

The medium was same as shown in Table 4. The preparations of cell wall used were prepared after cultivation for 4 days.

<sup>a)</sup> values are expressed as % dry weight of cell wall.

#### 4. プルラン生産と細胞質構成多糖の関連性の検討

プルラン生産と細胞質組成の関連性を検討するために、前述の細胞壁と同様にGL培地及びSA培地を用い、A-2-2株とB-3株の培養2日目と4日目の細胞から細胞質を調製して収量、組成及びプルランと $\alpha$ -グルカン含量を調べた。その結果をTable 7に示した。細胞質の収量は、2菌株ともSA培地では培養2日目より4日目の方が増加していたが、GL培地では逆に減少していた。細胞質に含まれる構成糖はグルコースのみであり、いずれの菌株においても培養日数にかかわらずGL培地で高かった。タンパク質含量はいずれの菌株においても培養日数にかかわらずSA培地で高かった。プルランを最も多量に生産したSA培地では、2菌株とも細胞質に含まれるグル

コースに対して高い割合でプルランが含まれることを示した。また2日目よりも4日目の方がプルラン含量は増加した。またGL培地におけるプルラン含量は低く、特にプルランをほとんど生産しないB-3株は、他の細胞質画分と比較するとプルラン含量は低かった。GL培地において唯一プルランを生産するA-2-2株は、SA培地の細胞質画分よりは低かったが、GL培地においても細胞質中にプルランが比較的高い割合で存在することが示された。また $\alpha$ -グルカン含量は、培地及び菌株に関係なく2日目よりも4日目の方が高く、グルコースの約7割から8割を占め、その増加率はいずれの菌株においてもSA培地で著しい傾向を示した。

## 考 察

#### 1. 菌体外多糖の生産条件について

*Aureobasidium*属による天然培地を用いたプルラン生産の報告はないが、本研究におけるトマト抽出液培地ではA-2-2株とB-3株において5 g/lと比較的高い菌体外多糖を得ることができた。トマト抽出液培地中のどの成分が多糖収量に影響を与えるのかは今後検討する必要があるが、廃棄資源利用の観点から有用であることが示唆された。B-3株の生産する菌体外多糖はA-2-2株よりグルカン含量は低かったが、プルラン収量は若干上回った (Table 1)。このことよりB-3株の生産する多糖中のグルカンは大部分がプルランで、A-2-2株の多糖はプルラン以外のグルカンも比較的多く含まれていると考えられる。多糖生産の経時的な変動 (Figure) から

Table 7. Influence of strain and culture medium upon yield, composition, and level of polysaccharide of cytoplasm.

| Strain | Medium | Incubation time (days) | Yield (g/l) | Composition (%) <sup>a)</sup> |       |                    |         | Level (%) <sup>a)</sup>  |                  |
|--------|--------|------------------------|-------------|-------------------------------|-------|--------------------|---------|--------------------------|------------------|
|        |        |                        |             | Glc.                          | Man.  | Gal.               | Protein | Pullulan                 | $\alpha$ -Glucan |
| A-2-2  | SA     | 2                      | 5.6         | 13.2                          | trace | N.D. <sup>b)</sup> | 13.1    | 3.7 (27.8) <sup>c)</sup> | 6.7 (50.5)       |
|        | SA     | 4                      | 7.4         | 12.0                          | N.D.  | N.D.               | 13.1    | 4.3 (35.3)               | 9.8 (81.7)       |
|        | GL     | 2                      | 6.4         | 23.3                          | trace | N.D.               | 9.4     | 2.7 (11.4)               | 12.3 (53.0)      |
|        | GL     | 4                      | 4.8         | 15.4                          | 1.2   | N.D.               | 8.2     | 4.2 (27.0)               | 11.3 (73.1)      |
| B-3    | SA     | 2                      | 6.6         | 10.9                          | trace | N.D.               | 27.1    | 2.1 (19.3)               | 3.4 (31.1)       |
|        | SA     | 4                      | 8.0         | 5.4                           | trace | N.D.               | 19.3    | 2.0 (37.0)               | 4.4 (81.6)       |
|        | GL     | 2                      | 8.6         | 27.5                          | trace | N.D.               | 15.7    | 0.4 ( 1.4)               | 14.2 (51.8)      |
|        | GL     | 4                      | 7.6         | 25.3                          | trace | N.D.               | 9.9     | 3.2 (12.7)               | 17.5 (69.3)      |

The medium was same as shown in Table 4. The preparation of cytoplasm used were prepared after cultivation for 2 or 4 days.

<sup>a)</sup> values are expressed as % dry weight of cytoplasm.

<sup>b)</sup> N. D., not detected.

<sup>c)</sup> values in parentheses are the percent of pullulan or  $\alpha$ -glucan level to the content of glucose in the cytoplasm.

も培養2日目以降もグルコース含量は徐々に増加したが、プルラン生産は培養2日目ではほぼ安定することが示された。このことよりプルラン生産は培養2日間ではほぼ終了するが、プルラン以外のグルカンはそれ以降も徐々に増加するのではないかと考えられる。

プルラン生産における培地中の成分と収量または多糖構造の関連性については、合成培地を用いて窒素源<sup>8-10)</sup>や炭素源<sup>9, 11)</sup>の影響が検討されている。窒素源は0.1%硫酸アンモニウムを用いた培養が菌体外多糖の収量もプルラン生産量もよく、ヘテロ多糖生産量も低かった (Table 2)。硫酸アンモニウムがプルラン生産において最も適しているという結果は、Simonら<sup>10)</sup>による報告と一致した。しかし彼らは、0.05%添加が最も多糖生産（収量は2.67 g/l）に適しているとしており、その最適濃度は異なっていた。一方、AuerとSeviour<sup>8)</sup>及びWestとReed-Hamer<sup>9)</sup>は様々な窒素源において多糖生産を比較し、前者は硝酸ナトリウム、後者は酒石酸アンモニウムがプルラン生産において最も適していると報告している。しかしながら、培養条件や菌株が異なることから、単純な比較はできず、種々の窒素源の影響については今後の検討課題である。

プルラン生産における炭素源はスクロースが最適であることがWestとReed-Hamer<sup>9)</sup>により示されている一方で、グルコースが最適であるという報告<sup>11)</sup>もあり、 $\beta$ -

1,3-グルカンを生産する炭素源であると報告<sup>18)</sup>があるキシロースも加え、これらの3種の炭素源についてプルラン生産への影響を比較した。多糖の収量はスクロース添加培地で、グルコース添加培地の約1.6倍の収量を示した (Table 1 及び 2)。今後は最適スクロース濃度の検討を行う必要がある。またB-3株はキシロースによって $\beta$ -1,3-グルカンの生産を促進せず、むしろガラクトマンナンと思われるヘテロ多糖の生産が示唆された。

アスコルビン酸が $\beta$ -1,3-グルカンの生産を賦活化するという報告<sup>4, 19, 20)</sup>に基づき、アスコルビン酸の多糖生産への影響を検討した結果、アスコルビン酸添加は $\beta$ -グルカンの合成を促進するのではなく、プルラン収量の増加を促進し、その添加濃度は多糖収量及びグルコース含量から1.0%が最も適していると思われた (Table 3)。

しかし、炭素源としてプルラン生産を促進するスクロースを用いた培地で窒素源やアスコルビン酸添加濃度の影響を検討しなかったため、これらのより明確な影響を確認することができなかった。今後、これらの検討を行う必要がある。

*Aureobasidium*属によって生産されるプルランはマルトリオースが $\alpha$ -1,6-結合で連結している構造の真正プルランの他に、 $\alpha$ -1,4-結合鎖数の異なっているプルラン様多糖がある<sup>2, 3, 10)</sup>。Silmanら<sup>3)</sup>によればプルラン様多糖の生産は菌株と培地組成によりその結合様式が異な



り、真正プルランの生産方法の確立は難しいことが指摘されている。さらに、*Aureobasidium*属はメラニン色素を生産し、その色素による多糖の黒色化が問題にされている。生産された色素は多糖と分離困難なため、プルラン生産においてメラニン色素の生産を抑制することは重要である<sup>3)</sup>。本研究で用いた3つの培地による培養においてメラニン色素を生産したのは、アスコルビン酸を添加していないS培地のみであり、アスコルビン酸は、メラニン色素生産を抑制する作用があることが示唆された。以上のことから、炭素源をスクロースにし、さらにアスコルビン酸添加を行ったSA培地がプルラン生産に最も適した培地であることが示された。メラニン着色を抑えた真正プルランがこれまでの報告よりも大量に生産されたことは、多糖産業的にも重要な意味があるように思われる。

## 2. 細胞壁及び細胞質と菌体外多糖の関連性について

*A. pullulans*の細胞壁多糖の構造については、これまでにBrownとLindberg<sup>22, 23)</sup>は、 $\beta$ -1,3-グルコース残基が主鎖の $\beta$ -1,3-, 1,6-グルカンと $\alpha$ -1,6-マンノース残基が主鎖のヘテロ多糖で構成されていると報告している。後にKataoka-Shirasugi<sup>24)</sup>は、 $\beta$ -1,3-, 1,6-グルカンとヘテロ多糖のより詳細な構造解析を報告しているが、これらの報告は菌体外多糖との関連性には全く触れてなく、他にもそのような報告はない。またSimon<sup>2, 10)</sup>は形態と多糖生産の関連性を報告しており、厚膜胞子の莢膜に形成された繊維状のプルランが、加水分解酵素によって培地中へ可溶化するとしている。この報告は、菌体外多糖は細胞壁に一時的に蓄積される可能性を示唆している。A-2-2株とB-3株を2種類の培地を用いて比較したが、細胞壁の構成成分や多糖構造に明確な違いは見られず、細胞壁多糖は主に $\beta$ -1,3-グルカンであった(Table 6)。プルラン生産と細胞壁の関連性を追求するには、形態形成との関連から同調培養を確立して、形態別による細胞壁構成成分の検討が必要と思われる。用いた2菌株とも細胞壁多糖は主に $\beta$ -1,3-グルカンであったことから、菌体外多糖中に含まれる微量の $\beta$ -1,3-グルカンは、溶菌した菌体の細胞壁から遊離した可能性も考えられる。

プルランを生産する培養条件によって得た細胞壁中にプルランの存在を極わずかしき確認することができなかったため、細胞質中のプルラン含量と $\alpha$ -グルカン量とを比較することによって細胞質のプルラン含量の割合が推定できると考えた。プルラン生産能力に応じて細胞質内

プルラン濃度が高まり(Table 7)、細胞壁にはプルランが殆ど検出されなかった(Table 5)ことは、プルランを生産する培養において細胞質中でプルランが合成され、細胞壁には蓄積せずに細胞外に分泌されることを示唆していた。本研究では、プルランとグリコーゲンの関連性の追求は行わなかったが、FinkelmanとVardanis<sup>25)</sup>は細胞内におけるグリコーゲン合成酵素の活性化系の関与を示唆しており、Regulez<sup>26)</sup>は脂質球とグリコーゲンユニットがプルラン合成に関与していると報告している。プルランを生産しない培養条件で細胞内グリコーゲン濃度が高い傾向を示したことは、彼らの指摘のように脂質球の不活化との関連性も考えられるが、酵素の活性との関連は今後の検討課題である。

## 3. プルラン生産と細胞形態の関連性について

*Aureobasidium*属は多形態のため、多糖生産と形態変化の関連性が検討されてきた<sup>2, 7, 10)</sup>が、未だ明確ではない。本研究においても、培養毎に形態観察を行い、形態と多糖合成との関連性を検討した。窒素源においては硫酸アンモニウム、炭素源においてはスクロース、アスコルビン酸添加においては高濃度添加ほど膨張細胞が多く(約25-50%)、他のプルランを生産しない培養条件(例えばGL培地のB-3株の培養では膨張細胞形成率が約5%)と比較して膨張細胞が多かった。このことより、膨張細胞とプルラン生産の関連性が示唆されるが、形態と多糖合成の関連性を追求するには、同調培養の確立が必要と思われる。一方、細胞壁構成多糖の成分や構造とプルラン生産の関連性を見いだすことができず、細胞形態による細胞壁構造の変化も明確にすることはできなかった。Simon<sup>2, 10)</sup>によると、厚膜胞子が真正プルランを生産する形態であると報告しているが、本研究においてはアスコルビン酸添加の場合のように厚膜胞子の形成を抑制しても、逆にプルラン生産を促進しており、厚膜胞子はプルラン生産に関与しないと思われた。AuerとSeviour<sup>8)</sup>は細胞形態と多糖生産の関連性はないとしており、プルラン合成は細胞形態とは独立した細胞内プルラン合成酵素の活性に依存していると思われる。これらについては、今後、同調培養系の確立や生化学的な検討が必要である。

## 摘 要

*Aureobasidium*属は、培地組成の変化により様々な菌体外多糖を生産することが知られている。本研究にお

いては、当研究室により分離された *Aureobasidium* spp. 4 菌株を使用し、廃棄資源の利用を目的としたトマト抽出液培地と、多糖生産に影響を及ぼす成分の検討のために種々の合成培地を使用して多糖生産の比較、細胞壁及び細胞質の多糖構造及び細胞形態との関連性を追求した。

トマト抽出液培地では4菌株すべてがプルランを生産したが、A-2-2株がプルラン生産菌として最も有用であり、その収量は約2.3 g/lであった。

B-3株を用いた合成培地におけるプルラン生産の有効成分の検討により、窒素源として0.1%の硫酸アンモニウム、炭素源として5%のスクロース、さらに1.0%のアスコルビン酸を添加した場合、最もプルランの生産に有効であった。その収量は約8.3 g/lであった。同じ条件においてA-2-2株では約11 g/lと最も高い収量であった。

細胞壁組成や多糖構造とプルラン生産の関連については顕著な関連性を見いだすことはできなかった。また細胞壁中にはプルランはほとんど存在せず、プルランを生産する条件下で比較的高濃度のプルランが細胞内に存在し、プルランは細胞壁中に蓄積されたり、細胞壁構成成分とはならず、細胞質中で合成された後、細胞外に分泌される可能性が示唆された。

プルランを多く生産する条件下では、膨張細胞の占める割合が高い傾向を示した。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、実験材料として用いたトマト果実を提供していただいた山形大学農学部附属農場に御礼申し上げます。

## 引 用 文 献

- 1) Hamada, N. and Tsujisaka, Y. (1983) The structure of the carbohydrate moiety of an acidic polysaccharide produced by *Aureobasidium* sp. K-1. Agric. Biol. Chem. 47 : 1167-1172.
- 2) Simon, L., Caye-Vaugien C. and Bouchonneau, M. (1993) Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans* : new observations. J. Gen. Microbiol. 139 : 979-985.
- 3) Silman, R. W., Bryan, W. L. and Leathers, T. D. (1990) A composition of polysaccharides from strains of *Aureobasidium pullulans*. FEMS Microbiol. Lett. 71 : 65-70.
- 4) 藤井 昇・篠原 智・上野 秀雄・今田 清久 (1984) *Aureobasidium*属菌(黒酵母)の生産する多糖について. 宮崎大学農学部研究報告 31 : 253-262.
- 5) Morishita, T., Takahashi, M., Sano, T., Kawamoto, I., Ando, K., Sano, H., Saitoh, Y., Kase H. and Matsuda, Y. (1991) Isolation and purification of HS-142-1, a novel nonpeptide antagonist for the atrial natriuretic peptide receptor, from *Aureobasidium* sp. Agric. Biol. Chem. 55 : 3017-3025.
- 6) 二國 二郎 (1977) 澱粉から他の他糖類へ. 澱粉科学ハンドブック 朝倉書店, 東京, pp. 523-531.
- 7) LeDuy, A., Zajic, J. E., Luong, T. H. T. and Choplin, L. (1988) In : Pullulan, Mark, H. F., Bikalis, N. M., Overberger, C. G. and Menges, G. (eds). Encyclopaedia of Polymer Science and Engineering, 2nd edn., Wiley New York, pp. 650-660.
- 8) Auer, D. P. F. and Seviour, R. J. (1990) Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. Appl. Microbiol. Biotech. 32 : 637-644.
- 9) West, T. P. and Reed-Hamer, B. (1991) Ability of *Aureobasidium pullulans* to synthesize pullulan upon selected sources of carbon and nitrogen. Microbios 67 : 117-124.
- 10) Simon, L., Bouchet, B., Caye-Vaugien, C. and Gallant, D. J. (1995) Pullulan elaboration and differentiation of the resting forms in *Aureobasidium pullulans*. Can. J. Microbiol. 40 : 35-45.
- 11) Catley, B. J. (1980) The extracellular polysaccharide pullulan produced by *Aureobasidium pullulans* : a relationship between elaborated rete and morphology. J. Gen. Microbiol. 120 : 265-268.
- 12) Finkelman, M. A. J. and Vardanis, A. (1982) Pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* protoplasts. Appl. Environ. Microbiol. 43 : 486-485.
- 13) Katohda, S., Abe, N., Matsui M. and Hayashibe,

- M. (1976) Polysaccharide composition of the cell wall of baker's yeast with special reference to cell walls obtained from large- and small-sized cells. *Plant & Cell Physiol.* 17 : 909-919.
- 14) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annal. Chem.* 28 : 350-356.
- 15) 百瀬勉・矢野良子 (1963) 3,6-ジニトロフタル酸による糖の微量定量. *化学の領域* 17 : 891-895.
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- 17) 大野正博・河東田茂義 (1996) *Hasegawaea japonica*の二形性と細胞壁構成多糖. *Nippon Nougai kagaku Kaishi* 70 : 781-786.
- 18) Bouveng, H.O., H. Kiessling, H., Lindberg, B. and McKay, J. (1962) Polysaccharide elaboration by *Aureobasidium pullulans*. *Acta. Chem. Scand.* 16 : 615-622.
- 19) 濱田信威・吉田茂義・渡辺保人 (1990) *Aureobasidium pullulans* K-1の生産する多糖の化学的および物理的性質. *科学と工業* 64 : 131-135.
- 20) Hamada, N. and Watanabe, Y. (1993) Stimulation by ascorbic acid of production of a highly branched  $\beta$ -1,3-glucan by *Aureobasidium* sp. K-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 : 1348-1349.
- 21) 藤井 昇・篠原 智 (1988) *Aureobasidium pullulans* FERM-P4257の産生する多糖について. *宮崎大学農学部研究報告* 35 : 119-124.
- 22) Brown, R. G. and Lindberg, B. (1967) Polysaccharides from cell walls of *Aureobasidium (Pullularia) pullulans*. Part I. Glucans. *Acta. Chem. Scand.* 21 : 2379-2382.
- 23) Brown, R. G. and Lindberg, B. (1967) Polysaccharides from cell walls of *Aureobasidium (Pullularia) pullulans*. Part II. Heteropolysaccharide. *Acta. Chem. Scand.* 21 : 2383-2389.
- 24) Kataoka-Shirasugi, N., Ikuta, J., Kuroshima, A. and Misaki, A. (1994) Antitumor activities and immunochemical properties of the cell-wall polysaccharides from *Aureobasidium pullulans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58 : 2145-2151.
- 25) Finkelman, M. and Vardanis, A. (1987) Glycogen metabolism in *Aureobasidium pullulans* : a glycogen synthetase with unusual activation. *CRC Critic. Rev. Biotech.* 5 : 185-193.
- 26) Regulez, P., Ponton, J., Dominguez, J. B., Coni, F. M. and Uruburu, F. (1980) Lipid composition and the transition from yeast-like to chlamidospore cells of *Aureobasidium pullulans*. *Can. J. Microbiol.* 26 : 1428-1432.